卷柏科药用植物种间遗传多样性的ISSR分析

孙红梅[1], 谷巍[1,*], 耿超[1], 孙庆文[2], 曹园[1]

[1]南京中医药大学药学院, 南京210023; [2]贵阳中医学院药学院, 贵阳550002

摘要: 应用ISSR分子标记技术对34种卷柏科植物(其中18种药用植物)进行遗传多样性分析。利用PopGene 32软件及NTsys 2.10e软件分析卷柏科34种植物的遗传多样性及亲缘关系, 并根据UPGMA法, 构建亲缘关系树状图。从100个随机引物中筛选出7条多态性稳定、条带清晰的引物, 共扩增出156条谱带, 多态性比例为100%。分析结果表明, 平均Shannon 信息指数为0.537, 平均 Nei's 基因多样性指数为0.359, 平均有效等位基因数为1.617, 34种卷柏科植物种间的遗传相似性系数在0.359~0.872, 显示出该植物类群具丰富的遗传多样性。聚类分析结果表明, 34种卷柏科植物之间有较明显的分界, 其中卷柏与垫状卷柏, 剑叶卷柏与异穗卷柏, 兖州卷柏和江南卷之间的亲缘关系较近, 分别聚为一类。初步证明利用ISSR分子标记可有效地分析卷柏科药用植物的遗传多样性, 从而为卷柏科植物的分类鉴定以及资源的合理开发利用提供理论基础和科学依据。

关键词: 卷柏科; ISSR; 遗传多样性; 聚类分析

卷柏科(Selaginellaceae)属于蕨类植物门石松纲, 仅卷柏属(*Selaginella*)一属(Banks等2011; Li等2014), 为多年生草本植物, 全世界共有700多种, 我国分布有70余种, 其中22种被记载具有药用价值(范晓磊等2007; 江苏省植物研究所和中国医学科学院药物研究所1990), 资源十分丰富。由于在植物物种进化及药用价值等方面具重要研究和开发应用价值, 该科植物已成为全球范围内的研究热点(Yang等2012; Zhao等2013; Wang等2015)。现代药理研究表明, 卷柏科药用植物不仅具有传统的清热解毒作用, 还具有抗肿瘤、降血糖、抗病毒、止血、免疫调节等多种功能, 显示了广阔的开发前景(邹辉等2012)。该科植物形态较为相似, 易于混淆, 其干燥后的药材用形态学方法鉴定更具一定难度。我们已成功对卷柏科34个物种进行了ITS2 序列的鉴定分析(Gu等2013), 在此基础上, 如何利用分子标记的方法研究该植物类群种间亲缘关系及遗传多样性, 对探讨其物种的起源演化和遗传资源的合理利用, 发掘野生种中有利基因具有十分重要的意义。

ISSR (inter simple sequence repeat)即简单序列重复区间扩增多态性分子标记(Zietkiewicz等1994)。该技术具有无需预知受试基因组序列, 成本低, 操作简单且稳定性好, 多态性高等特点(吴雪霞等2012)被认为是非常理想的分子标记方法, 目前已被广泛应用于植物遗传多样性分析(史艳才等2015)、DNA指纹图谱绘制(周文平等2015)及分子生态学研究等方面(Dogan等2015)。但至今尚未见ISSR技术在卷柏科植物研究中的相关报道。本文以卷柏科34种植物为样本(其中包括18种卷柏科药用植物), 运用ISSR分子标记, 从DNA水平上对卷柏科植物的遗传多样性及亲缘关系进行研究, 了解其变异程度, 并结合传统分类学进行分析, 以期为该植物类群的分类鉴定以及资源的合理开发利用提供理论基础和科学依据。

材料与方法

1 材料

研究材料涉及34种卷柏科植物, 其中18种为药用植物(表1)。样本经贵州省科学院生物研究所王培善教授和南京中医药大学药学院中药资源教研室谷巍教授鉴定, 凭证标本和数字影像资料保存于南京中医药大学药学院标本馆及贵阳中医学院药学院。

2 方法

2.1 仪器

实验所用仪器有Sigma 3-18K高速冷冻离心机(希格玛公司, 德国)、Eppendorf BioPhotometer分光

收稿 2015-11-16 修定 2016-02-16

资助 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(ZDXM-HT-1-5)、国家自然科学基金(81102772)、江苏省中药优势学科II期建设(ysxk-2014)和江苏省"青蓝工程" (2012)。

致谢 贵州省科学院生物研究所王培善教授、中国药科大学周荣汉教授、贵阳中医学院潘炉台教授和赵俊华教授对本文样品的提供与鉴定。

* 通讯作者(E-mail: guwei9926@126.com)。

表1 34种卷柏科植物样品来源

Table 1 Origins of 34 species of Selaginellaceae in this study

编号	植物中文学名	植物拉丁文学名	来源
1	薄叶卷柏*	*S. delicatula* (Desv.) Alston	贵州荔波
2	伏地卷柏*	*S. nipponica* Franch. et Sav.	贵州荔波
3	镰叶卷柏	*S. drepanophylla* Alston	贵州荔波
4	剑叶卷柏	*S. xipholepis* Baker	贵州荔波
5	翠云草*	*S. uncinata* (Desv. ex Poir.) Spring	贵州荔波
6	兖州卷柏*	*S. involvens* (Sw.) Spring	贵州荔波
7	疏松卷柏*	*S. effusa* Alston	贵州荔波
8	二形卷柏	*S. flagellifera* A. Braun ex Kuhn	贵州安龙县
9	膜叶卷柏	*S. leptophylla* Baker	贵州紫云猴场镇
10	块茎卷柏	*S. chrysocaulos* (Hook. et Grev.)	贵州紫云猴场镇
11	藤卷柏	*S. willdenowii* (Desv.) Baker	贵州望谟岩架镇
12	深绿卷柏*	*S. doederleinii* Hieron.	贵州五加河
13	毛枝卷柏*	*S. braunii* Baker.	贵州松桃县
14	细叶卷柏*	*S.labordei* Hieron. ex Christ	贵州安龙县
15	垫状卷柏*	*S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim.	贵州威宁县
16	红枝卷柏	*S. sanguinolenta* (L.) Spring	贵州盘县
17	贵州卷柏*	*S. kouycheensis* H. Lév.	贵州荔波
18	异穗卷柏*	*S. heterostachys* Baker	贵州贵阳
19	毛边卷柏	*S. chaetoloma* Alston	贵州贵阳
20	小翠云*	*S. kraussiana* A. Braun	贵州贵阳
21	卷柏*	*S. tamariscina* (P. Beauv.) Spring	江苏连云港
22	中华卷柏*	*S. sinensis* (Desv.) Spring	江苏连云港
23	江南卷柏*	*S. moellendorffii* Hieron.	江苏宜兴
24	波叶卷柏	*S. repanda* (Devs. ex Poir.) Spring	云南普文镇
25	钝叶卷柏	*S. amblyphylla* Alston	云南普文镇
26	澜沧江卷柏	*S. gebaueriana* Hand.	云南普洱市宁县
27	泰国卷柏	*S. siamensis* Hieron.	云南普洱市洱县
28	微齿钝叶卷柏	*S. omata* Spring	云南景洪市
29	繁叶卷柏	*S. frondosa* Warb.	云南勐仑镇
30	黑顶卷柏*	*S. picta* A. Br. ex Baker.	云南勐仑镇
31	缘毛卷柏*	*S. ciliaris* Spring	云南沧源县
32	细瘦卷柏	*S. vardei* Levl.	云南往钦县
33	攀缘卷柏	*S. helveri* Warb.	云南景洪市
34	疏叶卷柏*	*S. romotifolia* Spring	广西隆安县

加“*”者为药用植物。

光度计(艾本德股份公司, 德国)、Bio-Rad C1000PCR扩增仪(伯乐BIO-RAD公司, 美国)和Gel Doc XR+凝胶成像系统(伯乐BIO-RAD公司, 德国)。

2.2 基因组DNA的提取与检测

DNA提取: 采用植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技公司, 中国)提取总DNA。

DNA检测: 用1%琼脂糖凝胶电泳分析DNA的完整性, Gel Doc XR+凝胶成像系统观察拍照, Eppendorf 蛋白核酸分析仪(艾本德股份公司, 德国)检测DNA的纯度和浓度。

2.3 引物的合成与筛选

ISSR引物的合成根据加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布的引物序列(http://www.biotech.ubc.ca/ser vices/naps/primers.html), 由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 共100条, 从中筛选出7条扩增产物条带清晰、多态性较好的引物用于34种卷柏科植物遗传多样性分析。

2.4 ISSR反应体系和程序

ISSR-PCR 分析采用20 μL反应体系, 其中包括: 1.5 μL 10×缓冲液, 2.0 μL dNTPs (2.5 mmol·L^{-1}),

0.2 μL *Taq* DNA Polymerase (5 U·μL^{-1}) (TaKaRa公司), 1 μL引物, 0.5 μL (30 ng·μL^{-1}) DNA模板, 用超纯水补足至20 μL。PCR扩增反应在Bio-Rad C1000 Thermal Cycler PCR仪上进行, PCR扩增程序为: 95°C预变性300 s; 94°C变性30 s, 52.5°C退火30 s, 72°C延伸90 s, 35个循环; 72°C延伸600 s; 最后在4°C中保存。每个反应重复3次以确定所得条带的可重复性。

2.5 电泳检测

取8 μL PCR扩增产物和2 μL上样缓冲液混合, 于5%的聚丙烯酰胺凝胶上, 200 V电压电泳80 min, 银染后检测。

3 数据处理

ISSR是显性标记, 同一引物扩增中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性(王锦楠等2015), 按照相同迁移率位置上有带的记为“1”, 无带的记为“0”的方法, 记录 150~2 000 bp范围内的扩增条带, 生成“0-1”原始矩阵。根据“0-1”原始矩阵, 使用PopGene 32统计软件计算多态位点比率、有效等位基因数(Ne)、Shannon信息指数(I)和Nei’s基因多样性指数(He), 分析其遗传多样性。运用NTsys 2.10e软件计算出34种卷柏科植物各个物种间的遗传相似性系数及遗传距离。采用非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析, 根据遗传相似性系数建立聚类分析图。

实验结果

1 基因组DNA结果检测与分析

基因组DNA经1%的琼脂糖电泳检测, 无拖尾现象。Eppendorf BioPhotometer分光光度计检测所有DNA的A_{260}/A_{280}均在1.70~1.81, 样品浓度在220~300 ng·μL^{-1}, 说明提取的DNA纯度较高, 质量浓度较均匀, 符合实验的要求。

2 引物的筛选与遗传多样性分析

利用加拿大哥伦比亚大学提供的100条ISSR引物对34种卷柏科植物基因组DNA进行预扩增来筛选引物, 获得7条扩增效果较理想的引物, 引物名称和序列见表2。用这7条引物对所有34份材料进行PCR扩增检测, 结果显示, 7条引物共扩增出156条带(平均每个引物22.28条), 多态性条带156条, 其多态性条带比率为100%。其中引物UBC847扩增的条带最多(表2、图1)。34种卷柏科植物的ISSR-PCR扩增片段集中在150~2 000 bp, 也有少数特异位点在此范围以外(图1、2)。

表2 引物序列与多态性比率

Table 2 ISSR primer sequences and percentage of polymorphic bands

引物编号	引物序列(5′→3′)	总扩增带数/条	多态性条带/条	多态性比率/%
UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	39	39	100
UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	20	20	100
UBC857	CA CAC ACA CAC ACA CYG	16	16	100
UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	21	21	100
UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	18	18	100
UBC816	HVH TGT GTG TGT GTG TG	12	12	100
UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	28	28	100
总计		156	156	100

有效等位基因数(Ne)是指每个位点上等位基因结合的平均数目及其等位基因频率, 表示每个等位基因在遗传结构中的重要性, 是群体和群体以及群体内部各个基因位点间的遗传变异程度的度量指标。Shannon信息指数(I)是指信息论中描述“熵”的测度值, 它能够评价某一个随机交配群体所受的选择、突变和遗传漂变的综合影响程度。当其值越大, 混乱度越高, 群体的遗传多样性就越高(Liu等2015)。Nei’s基因多样性指数(He)衡量的是群体中基因的多少及其分布的均匀程度, 作为衡量群体变异水平的理想参数, 也是当前应用最广泛的指标(Liu等2014)。使用PopGene 32软件分析34种卷柏科植物的遗传多样性, 分析结果表明, 平均有效等位基因数为1.617, 平均Shannon 信息指数为0.537, 平均Nei’s基因多样性指数为0.359。就各位点而言, 其遗传程度也存在较大差别, 有效

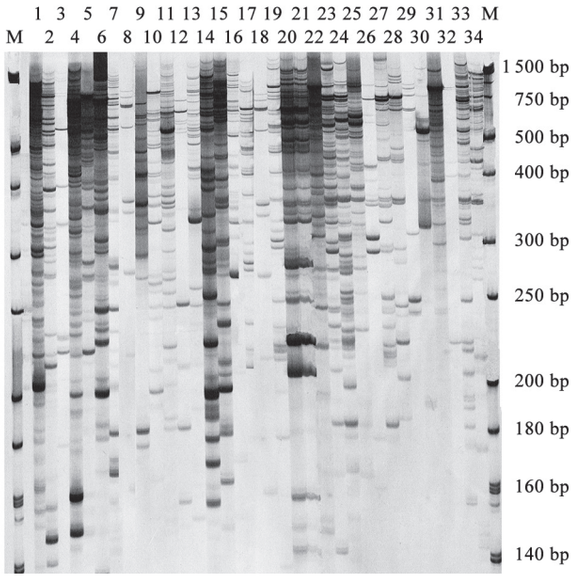

图1 引物UBC847对34种卷柏科植物的扩增结果

Fig.1 Amplification result of primer UBC847 in 34 species of Selaginellaceae

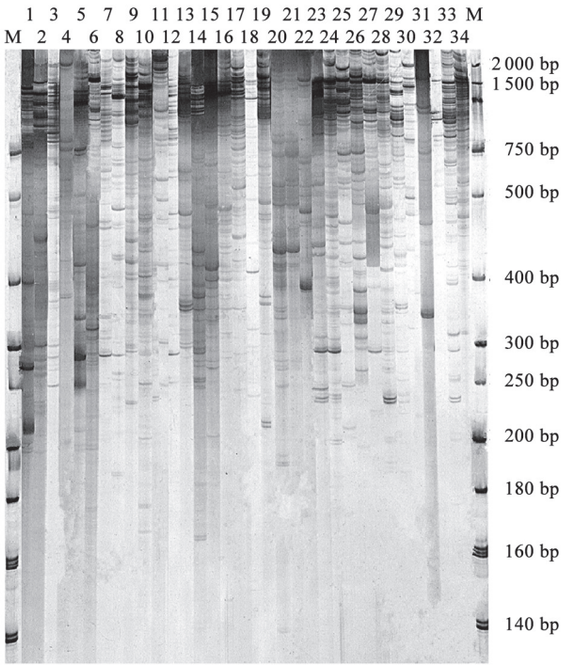

图2 引物UBC873对34种卷柏科植物的扩增结果

Fig.2 Amplification result of primer UBC873 in 34 species of Selaginellaceae

等位基因数(Ne)最大值为1.993, 最小值为1.125, Shannon信息指数(I)最大值为0.691, 最小值为0.224, Nei's基因多样性指数(He)最大值为0.498, 最小值为0.111。从以上数据可以看出, 34种卷柏科植物的种间遗传变异程度及遗传差异较大, 遗传多样性丰富, 利用ISSR分子标记能够检测卷柏科植物种间的亲缘关系及遗传多样性。

3 遗传相似性系数及聚类分析

利用NTsys 2.10e软件对34种卷柏科植物进行遗传相似性系数及遗传距离分析。结果表明34种卷柏科植物种间的遗传相似系数值变化为0.359~0.872, 平均为0.653。遗传距离数值变化为0.133~1.025, 平均为0.491。其中细叶卷柏与毛枝卷柏的相似性系数最大, 为0.872, 其相应的遗传距离也最小, 为0.133。其次是卷柏与垫状卷柏, 剑叶卷柏与异穗卷柏, 薄叶卷柏与翠云草遗传相似性系数为0.846, 遗传距离为0.167。说明它们之间的亲缘关系较近, 遗传差异较小。而澜沧江卷柏与中华卷柏的遗传相似性系数最小, 为0.359, 相应的遗传距离最大, 为1.025, 表明它们之间的亲缘关系较远, 遗传差异较大。各物种间的遗传相似性系数及遗传距离见表3。

根据遗传相似性系数, 按UPGMA方法进行聚类分析, 构建34份样品的聚类分析树状图(图3)。由聚类图可以看出34种卷柏科植物之间有较明显的分界, 7种ISSR引物可明显区分34种卷柏科植物之间的遗传差异。其中药典收载的卷柏与垫状卷柏, 民间常用的剑叶卷柏与异穗卷柏, 兖州卷柏和江南卷柏, 翠云草与薄叶卷柏, 细叶卷柏与毛枝卷柏等, 两两关系较近。而细瘦卷柏与其他植物遗传关系较远, 单独聚为一支。聚类结果显示ISSR分子标记构建的亲缘关系树状图与传统分类学基本吻合, 并在分子水平上显示了34种卷柏科植物间的亲缘关系。

讨 论

卷柏科植物种类多, 资源丰富, 其中相当数量的品种具有药用价值, 中国药典收载卷柏和垫状卷柏, 目前在许多现有成方制剂和中药处方中都有应用记载。另有20余个种类在民间药用, 如深绿卷柏、翠云草、江南卷柏、兖州卷柏等(邹辉等2012)。探索卷柏科药用植物种间的遗传多样性及亲缘关系对其开发利用具有重要意义。

表3 34种卷柏科植物种间遗传相似性系数(对角线上方)与遗传距离(对角线下方)

Table 3 Genetic identities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) of 34 species of Selaginellaceae

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1		0.769	0.718	0.564	0.846	0.590	0.667	0.667	0.667	0.590	0.795	0.692	0.744	0.718	0.718	0.744	0.718	0.564	0.462	0.641	0.821	0.718	0.436	0.692	0.641	0.590	0.718	0.641	0.795	0.821	0.590	0.564	0.744	0.744
2	0.262	****	0.692	0.692	0.821	0.564	0.641	0.692	0.744	0.615	0.718	0.769	0.718	0.692	0.641	0.615	0.692	0.641	0.539	0.718	0.692	0.795	0.513	0.769	0.769	0.513	0.641	0.718	0.769	0.641	0.667	0.539	0.667	0.615
3	0.331	0.368	****	0.692	0.718	0.615	0.692	0.641	0.590	0.564	0.667	0.667	0.718	0.641	0.590	0.615	0.692	0.590	0.692	0.615	0.590	0.692	0.564	0.718	0.718	0.615	0.692	0.821	0.718	0.692	0.718	0.539	0.667	0.615
4	0.573	0.368	0.368	****	0.615	0.667	0.590	0.641	0.641	0.564	0.667	0.667	0.667	0.641	0.590	0.513	0.539	0.846	0.846	0.667	0.539	0.539	0.667	0.769	0.718	0.718	0.692	0.667	0.615	0.539	0.769	0.487	0.615	0.513
5	0.167	0.198	0.331	0.486	****	0.590	0.667	0.821	0.821	0.590	0.846	0.692	0.744	0.718	0.718	0.692	0.769	0.615	0.462	0.795	0.769	0.718	0.487	0.744	0.744	0.487	0.718	0.641	0.744	0.769	0.590	0.564	0.795	0.744
6	0.528	0.573	0.486	0.406	0.528	****	0.513	0.615	0.564	0.487	0.590	0.590	0.539	0.513	0.564	0.692	0.462	0.564	0.615	0.539	0.615	0.513	0.795	0.590	0.744	0.846	0.564	0.590	0.590	0.564	0.539	0.513	0.590	0.487
7	0.406	0.445	0.368	0.528	0.406	0.668	****	0.539	0.692	0.769	0.615	0.615	0.821	0.795	0.641	0.513	0.795	0.487	0.539	0.615	0.641	0.590	0.462	0.615	0.667	0.564	0.590	0.667	0.615	0.641	0.564	0.539	0.564	0.718
8	0.406	0.368	0.445	0.445	0.198	0.486	0.619	****	0.692	0.513	0.821	0.667	0.667	0.641	0.590	0.718	0.641	0.590	0.487	0.718	0.590	0.539	0.564	0.718	0.718	0.615	0.744	0.615	0.667	0.641	0.615	0.539	0.769	0.564
9	0.406	0.296	0.528	0.445	0.198	0.573	0.368	0.368	****	0.718	0.718	0.615	0.718	0.692	0.692	0.615	0.795	0.641	0.487	0.718	0.641	0.590	0.513	0.667	0.769	0.513	0.641	0.615	0.615	0.641	0.513	0.539	0.667	0.615
10	0.528	0.486	0.573	0.573	0.528	0.719	0.262	0.668	0.331	****	0.692	0.590	0.744	0.769	0.615	0.539	0.769	0.513	0.462	0.590	0.513	0.513	0.487	0.539	0.590	0.539	0.564	0.641	0.487	0.513	0.590	0.462	0.539	0.539
11	0.230	0.331	0.406	0.406	0.167	0.528	0.486	0.198	0.331	0.368	****	0.641	0.795	0.769	0.718	0.744	0.769	0.667	0.513	0.692	0.667	0.615	0.539	0.744	0.641	0.641	0.718	0.641	0.641	0.667	0.692	0.615	0.744	0.641
12	0.368	0.262	0.406	0.406	0.368	0.528	0.486	0.406	0.486	0.528	0.445	****	0.692	0.615	0.564	0.539	0.615	0.564	0.564	0.692	0.615	0.667	0.539	0.692	0.641	0.539	0.615	0.692	0.846	0.564	0.641	0.513	0.641	0.487
13	0.296	0.331	0.406	0.296	0.296	0.619	0.198	0.406	0.331	0.296	0.230	0.368	****	0.872	0.564	0.590	0.821	0.564	0.564	0.692	0.564	0.615	0.487	0.692	0.744	0.641	0.615	0.744	0.641	0.667	0.692	0.513	0.641	0.590
14	0.331	0.368	0.445	0.445	0.331	0.668	0.230	0.445	0.368	0.262	0.262	0.486	0.137	****	0.641	0.564	0.744	0.539	0.487	0.667	0.590	0.590	0.410	0.615	0.667	0.615	0.692	0.718	0.615	0.692	0.615	0.385	0.564	0.615
15	0.331	0.445	0.528	0.528	0.331	0.573	0.445	0.528	0.368	0.486	0.331	0.573	0.573	0.445	****	0.667	0.590	0.590	0.487	0.564	0.846	0.590	0.462	0.564	0.564	0.513	0.692	0.462	0.564	0.692	0.513	0.590	0.615	0.821
16	0.296	0.486	0.486	0.668	0.368	0.368	0.668	0.331	0.486	0.619	0.296	0.619	0.528	0.573	0.406	****	0.564	0.462	0.462	0.590	0.667	0.615	0.539	0.590	0.692	0.641	0.667	0.590	0.590	0.769	0.487	0.667	0.590	0.641
17	0.331	0.368	0.368	0.619	0.262	0.773	0.230	0.445	0.230	0.262	0.262	0.486	0.198	0.296	0.528	0.573	****	0.590	0.487	0.718	0.590	0.641	0.513	0.718	0.667	0.513	0.590	0.667	0.667	0.641	0.667	0.539	0.615	0.667
18	0.573	0.445	0.528	0.167	0.486	0.573	0.719	0.528	0.445	0.668	0.406	0.573	0.573	0.619	0.528	0.773	0.528	****	0.795	0.615	0.539	0.487	0.615	0.821	0.615	0.615	0.641	0.513	0.564	0.487	0.769	0.487	0.667	0.513
19	0.773	0.619	0.368	0.167	0.773	0.486	0.619	0.719	0.719	0.773	0.668	0.573	0.573	0.719	0.719	0.773	0.719	0.230	****	0.564	0.487	0.487	0.667	0.718	0.667	0.667	0.539	0.667	0.564	0.436	0.821	0.539	0.462	0.462
20	0.445	0.331	0.486	0.406	0.230	0.619	0.486	0.331	0.331	0.528	0.368	0.368	0.368	0.406	0.573	0.528	0.331	0.486	0.573	****	0.667	0.615	0.539	0.744	0.692	0.436	0.615	0.590	0.641	0.564	0.692	0.462	0.692	0.692
21	0.198	0.368	0.528	0.619	0.262	0.486	0.445	0.528	0.445	0.668	0.406	0.486	0.573	0.528	0.167	0.406	0.528	0.619	0.719	0.406	****	0.744	0.513	0.667	0.615	0.462	0.641	0.513	0.667	0.692	0.564	0.590	0.718	0.821
22	0.331	0.230	0.368	0.619	0.331	0.668	0.528	0.619	0.528	0.668	0.486	0.406	0.486	0.528	0.528	0.486	0.445	0.719	0.719	0.486	0.296	****	0.462	0.667	0.615	0.359	0.590	0.667	0.718	0.692	0.615	0.539	0.615	0.564
23	0.830	0.668	0.573	0.406	0.719	0.230	0.773	0.573	0.668	0.719	0.619	0.619	0.719	0.891	0.773	0.619	0.668	0.486	0.406	0.619	0.668	0.773	****	0.692	0.692	0.744	0.564	0.590	0.539	0.462	0.590	0.462	0.539	0.436
24	0.368	0.262	0.331	0.262	0.296	0.528	0.486	0.331	0.406	0.619	0.296	0.368	0.368	0.486	0.573	0.528	0.331	0.198	0.331	0.296	0.406	0.406	0.368	****	0.692	0.590	0.718	0.692	0.744	0.615	0.795	0.564	0.692	0.590
25	0.445	0.262	0.331	0.331	0.296	0.296	0.406	0.331	0.262	0.528	0.445	0.445	0.296	0.406	0.573	0.368	0.406	0.486	0.406	0.368	0.486	0.486	0.368	0.368	****	0.692	0.615	0.795	0.641	0.667	0.641	0.513	0.641	0.590
26	0.528	0.668	0.486	0.331	0.719	0.167	0.573	0.486	0.668	0.619	0.445	0.619	0.445	0.486	0.668	0.445	0.668	0.486	0.406	0.830	0.773	1.025	0.296	0.528	0.368	****	0.667	0.641	0.590	0.564	0.590	0.564	0.539	0.436
27	0.331	0.445	0.368	0.368	0.331	0.573	0.528	0.296	0.445	0.573	0.331	0.486	0.486	0.368	0.368	0.406	0.528	0.445	0.619	0.486	0.445	0.528	0.573	0.331	0.486	0.406	****	0.667	0.718	0.795	0.564	0.487	0.718	0.564
28	0.445	0.331	0.198	0.406	0.445	0.528	0.406	0.486	0.486	0.445	0.445	0.368	0.296	0.331	0.773	0.528	0.406	0.668	0.406	0.528	0.668	0.406	0.528	0.368	0.230	0.445	0.406	****	0.744	0.667	0.692	0.564	0.539	0.487
29	0.230	0.262	0.331	0.486	0.296	0.528	0.486	0.406	0.486	0.719	0.445	0.167	0.445	0.486	0.573	0.528	0.406	0.573	0.573	0.445	0.406	0.331	0.619	0.296	0.445	0.528	0.331	0.296	****	0.718	0.641	0.564	0.641	0.590
30	0.198	0.445	0.368	0.619	0.262	0.573	0.445	0.445	0.445	0.668	0.406	0.573	0.406	0.368	0.368	0.262	0.445	0.719	0.830	0.573	0.368	0.368	0.773	0.486	0.406	0.573	0.230	0.406	0.331	****	0.462	0.539	0.615	0.718
31	0.528	0.406	0.331	0.262	0.528	0.619	0.573	0.486	0.668	0.528	0.368	0.445	0.368	0.486	0.668	0.719	0.406	0.262	0.198	0.368	0.573	0.486	0.528	0.230	0.445	0.528	0.573	0.368	0.445	0.773	****	0.513	0.590	0.539
32	0.573	0.619	0.619	0.719	0.573	0.668	0.619	0.619	0.619	0.773	0.486	0.668	0.668	0.956	0.528	0.406	0.619	0.719	0.619	0.773	0.528	0.619	0.773	0.573	0.668	0.573	0.719	0.573	0.573	0.619	0.668	****	0.513	0.615
33	0.296	0.406	0.406	0.486	0.230	0.528	0.573	0.262	0.406	0.619	0.296	0.445	0.445	0.573	0.486	0.528	0.486	0.406	0.773	0.368	0.331	0.486	0.619	0.368	0.445	0.619	0.331	0.619	0.445	0.486	0.528	0.668	****	0.590
34	0.296	0.486	0.486	0.668	0.296	0.719	0.331	0.573	0.486	0.619	0.445	0.719	0.528	0.486	0.198	0.445	0.406	0.668	0.773	0.368	0.198	0.573	0.830	0.528	0.528	0.830	0.573	0.719	0.528	0.331	0.619	0.486	0.528	****

1~34对应的植物名见表1。

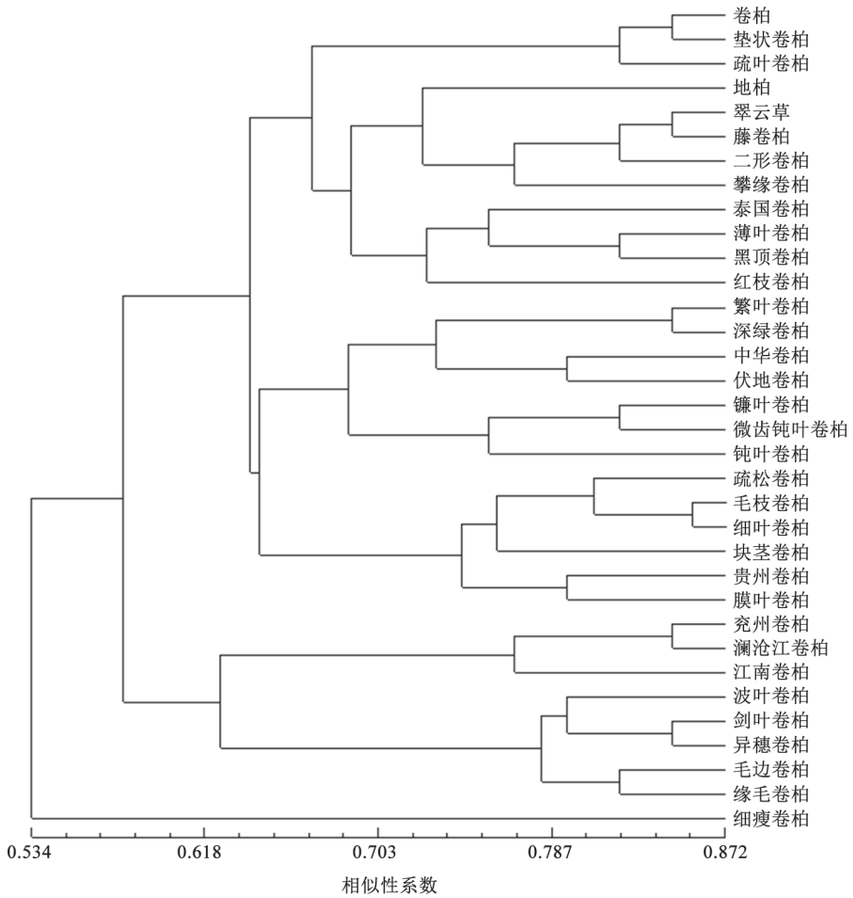

图3 34种卷柏科植物UPGMA聚类树状图

Fig.3 UPGMA dendrogram of 34 species in Selaginellaceae

本文首次应用ISSR分子标记对卷柏科植物的遗传多样性及亲缘关系进行分析, 所研究物种几乎涵盖所有卷柏科药用植物, 包括《中国药典》收载的卷柏和垫状卷柏以及中国特有的中华卷柏等, 物种来源覆盖卷柏科植物主要分布区贵州、云南、广西、江苏等省份的多个地区, 保证了实验结果的科学性和代表性。研究结果表明: 扩增的ISSR片段多态性高, 种间遗传相似系数变幅较大, 遗传多样性较丰富。由聚类分析可以看出, 不同卷柏科药用植物之间有较明显的分界线, 其中药典收载的卷柏和垫状卷柏, 民间常用的江南卷柏和兖州卷柏等遗传相似性系数较高, 亲缘关系较近, 实验结果也为传统分类学提供了依据与佐证。

综上, 卷柏科34种植物的ISSR分子标记分析结果表明, ISSR是一种重现性好、检测多态能力强的分子标记方法(侯思宇等2011), 能较好地用于分析卷柏科植物种间的遗传多样性及亲缘关系, 且能灵敏地揭示亲缘关系相近物种之间的遗传差异, 为该科植物的分类鉴定以及资源的合理开发利用提供理论基础和科学依据。

参考文献

Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, et al (2011). The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. Science, 332: 960–963

Dogan B, Duran A, Seker M, Çetin Ö, Martin E (2015). Study of phylogenetic relationship of Turkish species of *Klasea* (Asteraceae) based on ISSR amplification. PhytoKeys, 56: 29–40

Fan XL, Wan DR, Ye CJ, Chen KL (2007). Study on HPLC fingerprint characteristics of *Selaginella* plants. Chin J Chin Mater Med, 20 (23): 2102–2106 (in Chinese with English abstract) [范晓磊, 万

定荣, 叶丛进, 陈科力(2007). 卷柏属药用植物的HPLC指纹特征研究. 中国中药杂志, 20 (23): 2102–2106]

Gu W, Song JY, Cao Y, Sun QW, Hui Y, Wu QN, Chao JG, Zhou JJ, Xue WD, Duan JA (2013). Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. PLoS ONE, 5 (6): e67818

Hou YS, Sun ZX, Shen J, Wang YG, Han YH (2011). Genetic variation among thirty *Ziziphus jujuba* Mill. cultivars as revealed by ISSR marker assays. Plant Physiol J, 43 (3): 275–280 (in Chinese with English abstract) [侯思宇, 孙朝霞, 申洁, 王玉国, 韩渊怀(2011). 30个枣树种质资源遗传多样性的ISSR分析. 植物生理学报, 43 (3): 275–280]

Institution of Botany of Jiangsu Province, Institute of Material Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (1990). Xinhua Bencao Gangyao (Vol. 3). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 626–628 (in Chinese) [江苏省植物研究所, 中国医学科学院药物研究所(1990). 新华本草纲要(第3册). 上海: 上海科技出版社, 626–628]

Li J, Lei X, Chen K (2014). Comparison of cytotoxic activities of extracts from *Selaginella* species. Pharmacogn Mag, 10 (40): 529

Liu C, Xue GP, Cheng B, Wang X, He J, Liu GH, Yang WJ (2014). Genetic diversity analysis of *Capparis spinosa* L. populations by using ISSR markers. Genet Mol Res, 14 (4): 16476–16483

Liu MM, Xing YM, Guo SX (2015). Diversity analysis of *Polyporus umbellatus* in China using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Biol Pharm Bull, 38 (10): 1512–1517

Shi YC, Zou Y, Fan JS, Chen ZY, Wei JQ, Jiang YS (2015). Analysis of genetic relationships between *Heteroplex* by ISSR. Seed, (4): 5–12 (in Chinese with English abstract) [史艳财, 邹蓉, 范进顺, 陈宗游, 韦记青, 蒋运生(2015). 异裂菊属植物种间亲缘关系的ISSR分析. 种子, (4): 5–12]

Wang JN, LI JH, Qi X, Yao PJ, Xu D (2015). Genetic stability analysis in somatic embryo regeneration of *Erica carnea* by RAPD and ISSR markers. Plant Physiol J, 51 (4): 488–494 (in Chinese with English abstract) [王锦楠, 李际红, 亓晓, 姚培娟, 许东(2015). 欧石楠体细胞胚再生过程中遗传稳定性的RAPD和ISSR分析. 植物生理学报, 51 (4): 488–494]

Wang JZ, Li J, Zhao P, Ma WT, Feng XH, Chen KL (2015). Antitumor activities of ethyl acetate extracts from *Selaginella doederleinii* Hieron *in vitro* and *in vivo* and its possible mechanism. Evid Based Complement Alternat Med, 2015: 865714

Wu XX, Zha DS, Zhu ZW, Xu S (2012). Genetic diversity of salt-tolerent eggplant cultivars by SRAP and ISSR markers. Plant Physiol J, 48 (8): 789–794 (in Chinese with English abstract) [吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 许爽(2012). 茄子耐盐种质资源遗传多样性的SRAP和ISSR分析. 植物生理学报, 48 (8): 789–794]

Yang C, Shao YT, Li K, Xia W (2012). Bioactive selaginellins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. Beilstein J Org Chem, 8: 1884–1889

Yobi A, Wone BW, Xu W, Alexander DC, Guo L, Ryals JA, Oliver MJ, Cushman JC (2012). Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. Plant J, 72 (6): 983–999

Zhao SM, Fu FL, Gou L, Wang HG, He G, Li WC (2013). Cloning and truncation modification of trehalose-6-phosphate synthase gene from *Selaginella pulvinata*. Gene, 512 (2): 414–421

Zhou WP, Zhang HJ, Wang YF, Wang JZ, Cao XY (2015). Analysis of ISSR amplification results of six species in sect. *Cruciata* gaudin. J Chin Med Mater, 38 (7): 1375–1378 (in Chinese with English abstract) [周文平, 张惠娟, 王亚飞, 王喆之, 曹晓燕(2015). 秦艽组6种植物的ISSR扩增结果分析. 中药材, 38 (7): 1375–1378]

Zietkiewiez E, Rafslski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176–183

Zou H, Xu KP, Tan GS (2012). Advances in research on chemical constituents and pharmacological activities of genus *Selaginella*. Nat Prod Res Dev, 24: 1655–1670 (in Chinese with English abstract) [邹辉, 徐康平, 谭桂山(2012). 卷柏属植物化学成分及药理活性研究进展. 天然产物研究与开发, 24: 1655–1670]

Genetic diversity analysis of medicinal plants of Selaginellaceae based on ISSR markers

SUN Hong-Mei[1], GU Wei[1,*], GENG Chao[1], SUN Qing-Wen[2], CAO Yuan[1]

[1]College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; [2]College of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: ISSR (inter simple sequence repeat) markers was used to analyze the genetic diversity and relatedness of 34 species of Selaginellaceae (18 medicinal species included). The molecular marker technique ISSR was used to investigate the genetic diversity and relatedness of 34 species of Selaginellaceae. Data was analyzed by PopGene 32 and NTsys 2.10e, and a cluster diagram was presented by UPGMA. 100 primers were tested, among which seven gave reliable polymorphic banding patterns. Amplification from the accessions of the seven primers yielded 156 genetic loci with 100% polymorphism. The results from PopGene 32 software indicated that the average Shannon information index was 0.537, the average Nei's gene diversity index was 0.359, the average effective number of alleles was 1.617, and the genetic similarity coefficient of varieties was between 0.359 and 0.872, which showed enriched genetic diversity. There are obvious boundaries between 34 species of Selaginellaceae. Interestingly, *Selaginella tamariscina* and *S. pulvinata*, *S. xipholepis* and *S. heterostachys*, *S. moellendorffii* and *S. involvens* are clustered into one group, respectively, indicating their closer relationship. The results were basically consistent with the traditional plant morphotaxonomy and indicated that the ISSR method is suitable for the genetic diversity analysis of Selaginellaceae species, thus providing a scientific foundation for their species identification and development and applications.

Key words: Selaginellaceae; ISSR; genetic diversity; cluster analysis

Received 2015-11-16 Accepted 2016-02-16

This work was supported by Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization (Grant No. ZDXMHT-1-5), National Natural Science Fundation of China (Grant No. 81102772), the Discipline Construction Project of Jiangsu Colleges and Universities (ysxk-2014), and Qing Lan Project of Jiangsu Province (2012).

*Corresponding author (E-mail: guwei9926@126.com).